

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C07H 1/08	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/40098 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. August 1999 (12.08.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00413 (22) Internationales Anmeldedatum: 22. Januar 1999 (22.01.99)	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 198 04 243.4 4. Februar 1998 (04.02.98) DE (71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): MICHELSEN, Uwe [DE/DE]; Am Drachenstein 17, D-69469 Weinheim (DE). HOLSCHUH, Karl [DE/DE]; Weinbergstrasse 16, D-64342 Seeheim-Jugenheim (DE). HENDRIKS, Robertus [NL/DE]; Zum Steinberg 46, D-69121 Heidelberg (DE).	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: METHOD FOR ISOLATING AND PURIFYING NUCLEIC ACIDS (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON NUCLEINSÄUREN (57) Abstract The present invention relates to a method for isolating and purifying nucleic acids from liquid samples, wherein said method comprises using a solid carrier-material which is essentially made of oxide inorganic materials containing hydroxyl groups (e.g. silica gel or hydroxylapatite). The nucleic acids are bound to the carrier material in the acidic pH range while they are eluted in the alkaline pH range. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung und Aufreinigung von Nucleinsäuren aus flüssigen Proben mit Hilfe eines festen Trägermaterials, das im wesentlichen aus anorganischen hydroxylgruppenhaltigen oxidischen Materialien (z.B. Kieselgel oder Hydroxylapatit) besteht, wobei die Nucleinsäuren im sauren pH-Bereich an das Trägermaterial gebunden und im alkalischen pH-Bereich eluiert werden.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

**Verfahren zur Isolierung und Aufreinigung
von Nucleinsäuren**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung und Aufreinigung von
5 Nucleinsäuren aus Flüssigkeiten mit Hilfe eines festen Trägermaterials.

Es existiert ein umfangreicher Stand der Technik, der die Isolierung von
Nucleinsäuren aus Körperflüssigkeiten beschreibt. Ältere Methoden um-
fassen mehrere Arbeitsschritte: Anreicherung der Nucleinsäure enthalten-
10 den Zellen oder Kompartimente, Lysis derselben, Abtrennung der Protein-
und Membranfraktionen, Ausfällen der gereinigten Nucleinsäuren zur Ent-
fernung kontaminierender Chemikalien. Neuere Methoden benutzen Fest-
phasenextraktionen, wobei unter spezifischen Reaktionsbedingungen die
Nucleinsäure enthaltenden Kompartimente lysiert und DNA und RNA oder
15 deren Subpopulationen an die Festphase gebunden werden. Spezifische
Reaktionsbedingungen sind hochmolare Konzentrationen von bestimmten
chaotropen Substanzen oder von wasserlöslichen organischen Lösungs-
mitteln. Ebenso kann hochmolekulare, genomische DNA eukaryontischer
Zellen durch einfache Lysis der Zellen mittels Detergenz und physikalische
20 Interaktion der langen DNA-Fäden mit Mikropartikeln oder großporigen
Filtern eingefangen und gereinigt werden. Es ist auch bekannt, daß
gereinigte Nucleinsäuren in wäßrigem Milieu an Chromatographiematerial
wie Hydroxylapatit binden und mit relativ hochmolarem Phosphatpuffer
abgelöst werden können.

25 Aus US 5,234,809 ist ein Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren
bekannt, wobei die Bindung an eine feste Phase in Gegenwart hoher
Konzentrationen von chaotropen Substanzen wie Guanidiniumsalzen,
Natriumjodid, Natriumthiocyanat oder Harnstoff erfolgt. Die gebundenen
30 Nucleinsäuren werden mit einem eine chaotropen Substanz enthaltenden
Waschpuffer gewaschen. Anschließend wird zur Entfernung der hoch-
konzentrierten Salze mit einer Alkohol und/oder Aceton enthaltenden

Waschlösung gewaschen. Die Elution der Nucleinsäuren erfolgt nach sorgfältiger Entfernung der organischen Lösungsmittel mit Wasser oder mit Puffer niedriger Ionenstärke. Ähnliche Verfahren sind aus EP 0 572 907 bekannt.

5

Nach WO 96/18731 soll die Bindung an die feste Phase in Gegenwart von Detergenzien unter neutralen Pufferbedingungen erfolgen. Das Verfahren hat jedoch den Nachteil, daß nur langkettige DNA-Moleküle wie genomische DNA eukaryontischer Zellen an die feste Phase gebunden werden 10 können. Kurze DNA-Moleküle wie auch RNA-Moleküle können unter den beschriebenen Pufferbedingungen nicht direkt isoliert werden.

Die beschriebenen Methoden zur Isolierung und Aufreinigung von Nucleinsäuren weisen eine Reihe von Nachteilen auf. Chaotrop Substanzen in 15 hohen Konzentrationen, organische Lösungsmittel und Detergenzien wirken inhibierend auf nachfolgende molekularbiologische Reaktionen, zu deren Zweck die Nucleinsäuren isoliert werden. Intensive Waschschritte oder Trockenschritte sind erforderlich, um diese Inhibitoren quantitativ zu entfernen. Auch für Automationsvorhaben mit dem Ziel, aus einer hohen 20 Anzahl von Proben schnell und reproduzierbar Genmaterial zu isolieren, sind die beschriebenen Chemikalien und Waschschritte hinderlich.

In WO 97/34 909 wird ein Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren offenbart, bei dem die Nucleinsäuren aus der Probe an einem organischen 25 vernetzten Polymer, das basische Gruppen aufweist, gebunden werden. Für diesen Bindungsschritt sind Zusätze von Detergenzien, chaotropen Substanzen oder organischen Lösungsmitteln nicht notwendig. Jedoch erfolgt die Bindung langsam und erfordert Inkubationszeiten von einer Stunde oder mehr.

30

Es stellt sich also die Aufgabe, ein Verfahren zur Isolierung und Aufreinigung von Nucleinsäuren bereitzustellen, das ohne störenden Zusatz der

genannten Substanzen (z.B. chaotrope Substanzen) ausführbar ist, und das eine kurze Inkubationszeit erfordert. Die isolierten beziehungsweise aufgereinigten Nucleinsäuren (DNA und RNA) sollten sofort nach Elution von der Festphase für molekularbiologische Reaktionen eingesetzt werden
5 können.

Es wurde gefunden, daß bei Verwendung von anorganischen hydroxylgruppenhaltigen oxidischen Materialien eine Bindung von Nucleinsäuren an diese Trägermaterialien auch ohne Zusatz von chaotropen Substanzen
10 möglich ist, wenn durch den Bindungspuffer der pH auf 1 bis 6 erniedrigt wird. Diese Bindung erfolgt schnell, d.h. innerhalb von weniger als 15 Minuten. Nach einem optionalen Waschschritt kann die Nucleinsäure durch einen Elutionspuffer mit einem pH-Wert zwischen 7,5 und 11 in Lösung gebracht werden und steht für weitere molekularbiologische
15 Reaktionen bereit.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung und Aufreinigung von Nucleinsäuren aus flüssigen Proben, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:
20 a) Bereitstellen einer flüssigen Probe, die Nucleinsäuren enthält;
b) Bereitstellen eines Trägermaterials aus einem anorganischen hydroxylgruppenhaltigen oxidischen Material;
c) Verdünnen der Probe aus Schritt a) mit einem Bindungspuffer;
d) Behandeln der mittels eines Bindungspuffers angesäuerten Probe
25 aus Schritt c) mit dem Trägermaterial aus Schritt b), wobei die Nucleinsäuren gebunden werden;
e) Abtrennen der Probe und des Bindungspuffers nach Bindung der Nucleinsäuren;
f) Eluieren der in Schritt d) gebundenen Nucleinsäuren mittels einer
30 alkalischen Lösung.

In bevorzugten Ausführungsformen wird ein Waschschritt e1) nach Schritt e) eingefügt, wobei der pH des dabei verwendeten Waschpuffers $\leq 6,5$ beträgt. In weiteren bevorzugten Ausführungsformen beträgt der pH des Bindungspuffers zwischen 3 und 6 und des Elutionspuffers 7,5 bis 9.

5 Bevorzugte Trägermaterialien sind Kieselgel und Hydroxylapatit.

Gegenstand der Erfindung sind ferner Reagenzzusammenstellungen für das erfindungsgemäße Verfahren zur Isolierung und Aufreinigung von Nucleinsäuren aus flüssigen Proben. In bevorzugten Ausführungsformen 10 enthalten diese Reagenzzusammenstellungen alle für die Durchführung des Verfahrens notwendigen Bestandteile: Trägermaterial, Bindungspuffer, einen oder mehrere Waschpuffer und Elutionspuffer. Es ist jedoch auch möglich, einzelne dieser Komponenten getrennt zu liefern, oder dem Benutzer die Beschaffung dieser Komponente zu überlassen, so daß auch 15 Reagenzzusammenstellungen beispielsweise ohne den Waschpuffer Gegenstand der Erfindung sind. Somit kann eine erfindungsgemäße Reagenzzusammenstellung auch zwei oder drei Bestandteile ausgewählt aus Trägermaterial, Bindungspuffer, Waschpuffer und Elutionspuffer umfassen, insbesondere beispielsweise Trägermaterial und Bindungspuffer 20 umfassen. Reagenzzusammenstellungen für das erfindungsgemäße Verfahren können ferner zusätzlich Hilfsmittel wie Zentrifugenröhrchen oder Dosierhilfen enthalten.

In Abbildung 1 werden die Bindungskinetiken für das erfindungsgemäße 25 Verfahren (Kurven (A) und (B)) mit einem Verfahren entsprechend dem Stand der Technik nach WO 97/34 909 (Kurven (C) und (D)) verglichen. Für die in den Kurven (B) und (D) dargestellten Meßergebnisse wurde der Probe Rinderserumalbumin zugesetzt, um die Verwendung der Verfahren für proteinhaltige Proben zu simulieren. Weitere experimentelle Einzelheiten finden sich in in der Beschreibung zu Vergleichsbeispiel A. 30

Als Trägermaterialien geeignete anorganischen hydroxylgruppenhaltigen oxidischen Materialien sind aus dem Stand der Technik, beispielsweise aus US 5,234,809 bekannt: Dazu gehören insbesondere kristalline oder amorphe Modifikationen von SiO₂ und Silikaten, d.h. beispielsweise Kieselgel, Kieselgur, Silikatgläser oder Zeolite, weiterhin auch Hydroxylapatite.

Bevorzugt als Trägermaterial sind kristalline oder amorphe Modifikationen von SiO₂ und Silikaten.

Die Trägermaterialien können in Form von Beads, Partikeln, Blättern, Gelen, Filtern, Membranen, Fasern, in Kapillaren, Streifen, Röhrchen, Mikrotiterplatten usw. vorliegen. Es können auch entsprechende magnetische Partikel verwendet werden. Die Trägermaterialien können beispielsweise auch als Beschichtung auf Gefäßen aufgebracht sein. Als Äquilibrierungspuffer für das Trägermaterial wird vorzugsweise einer der im folgenden genannten Bindungspuffer verwendet.

Die Bindung der Nucleinsäuren aus der Probe erfolgt durch einfaches Absenken des pH-Wertes auf unter pH 6. Dazu wird ein Bindungspuffer verwendet, der einem pH-Bereich von 1 bis 6, vorzugsweise von 3 bis 5, aufrechterhalten kann. Im bevorzugten pH-Bereich weisen bekanntermaßen die Purinbasen der Nukleinsäuren verbesserte Stabilität auf. Geeignete Puffer sind z.B. Formiat-, Acetat-, Citratpuffer oder andere Puffersysteme, die in dem genannten pH-Bereich ausreichende Pufferkapazität besitzen.

Die Pufferkonzentration sollte im Bereich von 10 bis 200 mM liegen, je nach der Pufferkapazität der zu untersuchenden Probeflüssigkeit. Vorzugsweise wird ein Bindungspuffer der Konzentration von 50 mM verwendet, der einen pH-Wert von ca. 4,5 hat, z.B. ein Puffer aus Essigsäure, der mit Natronlauge, Kalilauge oder mit Tris-Base auf einen pH-Wert zwischen 4 und 5 eingestellt wurde. Dem Bindungspuffer können Nucleaseinhibitoren

zugesetzt werden; geeignete Nucleaseinhibitoren sind dem Fachmann bekannt.

Ein Bindungspuffer entsprechend der vorliegenden Erfindung enthält weder
5 Phosphationen, noch andere Ionen in hohen Konzentrationen (> 200 mM),
noch ionische Detergenzen oder chaotrop Substanzen.

Bei den Nucleinsäuren enthaltenden Proben handelt es sich um wäßrige
Flüssigkeiten, wie Pufferlösungen und Homogenate oder komplexe biolo-
10 gische Flüssigkeiten, wie Blut, Serum, Plasma, Urin usw. oder um Gewe-
be- und Zelllysate.

Das Trägermaterial mit den daran gebundenen Nucleinsäuren kann mit
dem beschriebenen Bindungspuffer oder mit anderen phosphatfreien
15 Puffern gewaschen werden, wobei der pH-Wert dieser Puffer zwischen 4
und 7, vorzugsweise zwischen 4,5 und 6,5 liegen sollte. Die Pufferkonzen-
tration kann geringer sein als beim Bindungspuffer; sie sollte im Bereich
von 5 bis 50 mM, vorzugsweise bei etwa 8 bis 15 mM liegen. Gegebenen-
falls kann einer der Waschpuffer Zusatzstoffe, beispielsweise Chelatbildner
20 wie EDTA, chaotrop Substanzen und/oder nichtionische Detergenzen
enthalten. Die erfindungsgemäß offenbarten Waschpuffer eluieren die
gebundenen Nucleinsäuren nicht, selbst wenn diese unter Zusatz von
chaotropen Substanzen an das Trägermaterial adsorbiert wurden. In
einem Waschpuffer entsprechend der vorliegenden Erfindung sind Zusätze
25 von organischen Lösungsmitteln und/oder chaotropen Substanzen nicht
notwendig, um die vorzeitige Elution von Nucleinsäuren zu vermeiden.
Jedoch sind Zusätze der genannten Hilfsstoffe in dem Verfahren nach US
5,234,809 notwendig, um die vorzeitige Elution von Nucleinsäuren zu
vermeiden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung können
30 derartige Zusätze verwendet werden, um die isolierten Nucleinsäure-
präparationen zu reinigen, beispielsweise um adsorbierte Proteine von dem

Träger auszuwaschen. Für derartige Zwecke geeignete Zusätze und deren Konzentrationen sind dem Fachmann geläufig.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß die so gereinigte Nucleinsäure
5 durch eine einfache Erhöhung des pH-Wertes auf über 7,5 von der Festphase gelöst werden kann. Der dazu verwendete Elutionspuffer sollte einen pH-Bereich von 7,5 bis 9, vorzugsweise 8 bis 8,5 aufrechterhalten. Geeignete Puffer sind z.B. Tris-HCl-Puffer; Tricin, Bicin und andere Puffer, die in diesem pH-Bereich puffern, vorzugsweise Tris/HCl. Die Puffer-
10 konzentration sollte 5 bis 10 mM, vorzugsweise etwa 8 bis 10 mM betragen. Gegebenenfalls kann der Elutionspuffer Chelatbildner wie EDTA und/oder andere Inhibitoren von Nucleasen enthalten. Die eluierte Nucleinsäure ist direkt, ohne weitere Reinigungsschritte, für molekularbiologische Anwendungen, wie z.B. für Ampifikationsreaktionen einsetzbar.
15

Das Verfahren zur Isolierung und Aufreinigung von Nucleinsäuren wird entsprechend der vorliegenden Erfindung so durchgeführt, daß z.B. ein die Nucleinsäuren enthaltendes Serum mit dem Bindungspuffer versetzt und in ein Mikrozentrifugenröhren gegeben wird, das bereits die äquilibrierte
20 Festphase enthält. Nach einer Inkubationszeit wird zentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Mit einem Waschpuffer wird resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Es können auch mehrere Waschschrifte gegebenenfalls mit Waschpuffern unterschiedlicher Zusammensetzung nacheinander ausgeführt werden. Dementsprechend
25 kann eine erfindungsgemäße Reagenzzusammenstellung auch mehrere Waschpuffer enthalten. Schließlich wird der Elutionspuffer hinzugefügt, die Suspension zentrifugiert und der die Nucleinsäuren enthaltende Überstand in ein neues leeres Röhrchen überführt. Diese Lösung kann dann direkt für weitere Analysenmethoden (PCR, NASBA) eingesetzt werden. Bei der
30 Verwendung von z.B. entsprechenden magnetischen Beads kann die Zentrifugation durch das Anlegen eines magnetischen Felds ersetzt werden.

Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, daß ein Fachmann die obige Beschreibung im weitesten Umfang nutzen kann. Die bevorzugten Ausführungsformen und Beispiele sind deswegen lediglich als beschreibende, keineswegs als in irgendeiner Weise limitierende Offenbarung aufzufassen.

Die vollständige Offenbarung aller vor- und nachstehend aufgeführten Anmeldungen, Patente und Veröffentlichungen, sowie der korrespondierenden Anmeldung DE 198 04 243.4, eingereicht am 04.02.1998, sind durch Bezugnahme in diese Anmeldung eingeführt.

15 **Beispiel 1**

Materialien

Mikrozentrifugenröhrenchen

20 Bindungspuffer (BP): 50 mM Essigsäure/KOH, pH 4,5
Waschpuffer (WP): 10 mM Tris-HCl, pH 6,5
Elutionspuffer (EP): 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 9,0
DNA oder RNA: 1 ng - 1 µg
Partikel: 0,5 g in 1 ml 10 mM Tris-HCl, pH 6,5

25

30

Verfahrensschritte

1. 80 µl BP, 1 ng - 1 µg DNA/RNA, 1 µl Partikel (500 mg/ml) werden mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt,
- 5 2. die Mischung wird 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert,
3. es wird 10 Sekunden bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird verworfen,
4. die Partikel werden mit 200-500 µl WP resuspendiert,
5. die Schritte 3 und 4 werden wiederholt,
- 10 6. Schritt 3 wird wiederholt,
7. es werden 30 µl EP hinzugegeben,
8. es wird 10 Sekunden bei 5000 Rpm zentrifugiert, der Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt.

- 15 Es werden verschiedene Partikel eingesetzt: Hydroxylapatit (Merck Art. #1.05119) und Silica-Partikel (Merck Art. 1.01193). Diese werden mit und ohne Zusatz von Serum zum Bindungspuffer getestet. Die Konzentration an radioaktiv markierter Lambda-DNA pro Test entspricht etwa 1 ng. Die Radioaktivität ist in cpm · 1000 angegeben.

20

25

30

Pippettierschema [µl]

Probe Nr.	1	2	3	4	K1	K2
Partikel:	H	S	H	S		
H: Hydroxylapatit						
S: Silicagel						
Bindungspuffer (µl)	80	80	80	80	80	80
Serum (µl)			10	10		
Wasser (µl)	10	10			11	11
P-32 λ-DNA (µl)	9	9	9	9	9	9
Partikel (µl)	1	1	1	1		

Ergebnisse

Probe Nr.	1	2	3	4	K1	K2
Überstand [cpm]	22	14	7	17	179	173
gebunden [cpm]	154	162	169	159		
1. Elution [cpm] 5 Min., Tris-Puffer pH 9	114	132	94	139		
2. Elution [cpm] Phosphat-Puffer pH 7	36	4	56	1		
Rest auf Partikel [cpm]	5	16	7	4		
Bindungskapazität [%]	88	92	96	90		
Elutionseffizienz [%]						
1. Elution	74	81	55	87		
2. Elution	97	83	88	88		

Die hier benutzten Partikel mit unterschiedlichen chemischen Gruppen an der Oberfläche binden unter den gewählten Bedingungen 80 bis 96 % der markierten DNA. In der Regel wird über 80 % der gebundenen DNA durch einfache pH-Änderung (z.B. Tris-Puffer) wieder eluiert. Ein hochmolarer
5 Phosphat-Puffer (0,5 M) verbessert die Elutionseffizienz bei den Hydroxyl-
apatit-Partikeln.

Bei Verwendung entsprechender magnetischer Partikel wird die Zentrifugation durch das Anlegen eines magnetischen Feldes ersetzt.

10

Beispiel 2

Entsprechend Beispiel 1 wird eine Nucleinsäure enthaltende Probe (1 µg)
15 mit steigenden Mengen Serum versetzt. Zur Erhöhung der Pufferkapazität wird der Bindungspuffer bei hohen Serumkonzentrationen 4fach konzentriert eingesetzt (= 200 mM). Die Ausbeute wird über Ethidiumbromid gefärbte Nucleinsäurebanden in Agarosegelen bestimmt. Als Trägermaterial werden Silicapartikel verwendet.
20

25

Serum [µl]	0	10	20	30	50
1 x BP [µl]	80	80	70	-	-
4 x BP [µl]	-	-	-	50	40
Ausbeute DNA bzw. RNA	+++	++++	++++	++++	+++

25

Die Ergebnisse zeigen, daß die Bindung der Nucleinsäuren an Silicapartikel unabhängig von der Serumkonzentration ist.

30

Der obige Versuch wird unter Verwendung von Hydroxylapatitpartikeln anstelle der Silicapartikel wiederholt; auch bei Verwendung von Hydroxylapatit werden ähnliche Ergebnisse erhalten.

Beispiel 3

Entsprechend Beispiel 1 werden verschiedene Puffer mit verschiedenen pH-Werten eingesetzt und ihre Eignung als Bindungspuffer getestet. Als Trägermaterial werden Silicapartikel verwendet. DNA sowie RNA (ribosomale Hefe-RNA) wird in einer Endkonzentration von 0.5 µg eingesetzt. Die Ausbeute des Eluats wird über Ethidiumbromid gefärbte Nucleinsäurebanden in Agarosegelen bestimmt.

10 **Pipettierschema [µl]**

Probe Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Bindungspuffer														
Acetat/KOH pH 4,5	80	80												
Acetat/KOH pH 5,0			80	80										
Acetat/NaOH pH 4,5					80	80								
MES pH 5,5							80	80						
MES pH 6,0									80	80				
MES pH 6,5											80	80		
Tris-HCl pH 7,0												80	80	
Wasser	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
DNA/RNA	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Partikel (500 mg/ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Ergebnisse

Ausbeute in %	90	90	80	80	90	90	70	70	50	50	20	20	2	2
---------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	---	---

30 Die erhaltenen Ausbeuten wurden unabhängig von dem Trägermaterial erzielt. Die höchsten Ausbeuten wurden bei pH 4,5 erreicht.

Der Versuch wird unter Verwendung von Hydroxylapatitpartikeln anstelle der Silicapartikel wiederholt; es werden ähnliche Ergebnisse wie oben zusammengestellt erhalten.

5

Vergleichsbeispiel A

In einem Vergleichsversuch wurden die Bindungskinetiken des erfindungsgemäßen Verfahrens mit dem Verfahren unter Verwendung eines basischen organischen Polymers verglichen. Dazu wurden 1 µg λ Hind III-DNA (³²P-markiert; ca. 100 000 cpm) in 50 mM Kaliumacetat, pH 4,5, mit und ohne Zusatz von 10 mg/l Rinderserumalbumin (BSA), erfindungsgemäß an Silicapartikel, und zum Vergleich an ESTAPOR® -NH₂ Partikel (amino-derivatisiertes, vernetztes organisches Polymer) gebunden. Die Reaktion wird durch die Zugabe der Partikel gestartet; der Meßwert für 0 Minuten wird vor Zugabe der Partikel bestimmt. Durch Messung der Radioaktivität im Überstand wird die Bindungskinetik bestimmt; angegeben ist die Radioaktivität im Überstand:

20

Zeit (min)	erfindungsgemäß		organisches Polymer		(cpm / 1000)
	ohne BSA	mit BSA	ohne BSA	mit BSA	
25	0	91	94	91	93
	1	14	14	48	33
	5	5	1	25	22
	10	3	1	13	10
	15	4	1	9	8
	30	4	1	7	7
	60	4	1	4	3
	120	4	1	3	2

30

Es zeigt sich, daß bei dem erfindungsgemäßen Verfahren bereits nach 5 bis 10 Minuten der Sättigungsbereich für die Bindung der Nucleinsäure erreicht ist und somit nach 5 bis 10 Minuten ein reproduzierbares Bindungsverhalten erreicht wird. Bei Verwendung eines Trägers entsprechend dem Stand der Technik (organisches aminosubstituiertes Polymer) wird dies erst nach ein bis zwei Stunden erreicht.

Die Werte der obigen Tabelle sind in Abbildung 1 dargestellt. Für die einzelnen Meßreihen wurden dazu aus der jeweiligen Radioaktivität im Überstand und dem t_0 -Wert der prozentuale Anteil der am Träger gebundenen Radioaktivität bestimmt.

15

20

25

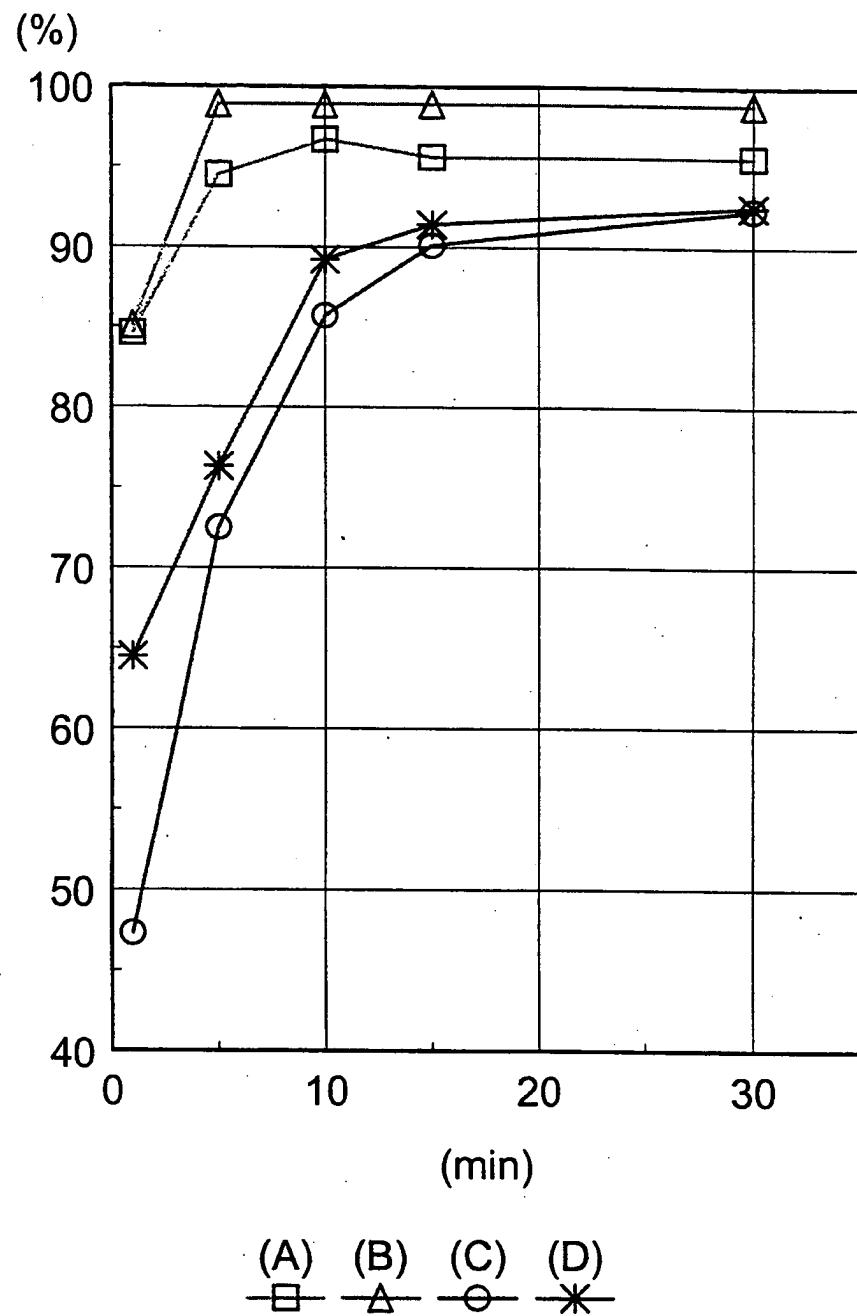
30

Ansprüche

1. Verfahren zur Isolierung und Aufreinigung von Nucleinsäuren aus flüssigen Proben, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:
 - 5 a) Bereitstellen einer flüssigen Probe, die Nucleinsäuren enthält;
 - b) Bereitstellen eines Trägermaterials aus einem anorganischen hydroxylgruppenhaltigen oxidischen Material;
 - c) Verdünnen der Probe aus Schritt a) mit einem Bindungspuffer;
 - d) Behandeln der mittels eines Bindungspuffers angesäuerten Probe aus Schritt c) mit dem Trägermaterial aus Schritt b), wobei die Nucleinsäuren gebunden werden;
 - e) Abtrennen der Probe und des Bindungspuffers nach Bindung der Nucleinsäuren;
 - f) Eluieren der in Schritt d) gebundenen Nucleinsäuren mittels einer alkalischen Lösung.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei nach Schritt e) ein Waschschnitt e1) mittels eines Waschpuffers bei einem pH-Wert $\leq 6,5$ ausgeführt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Bindungspuffer für den Schritt c) einen pH-Wert von 3 bis 6 aufweist.
- 25 4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein Elutionspuffer im pH-Bereich von 7,5 bis 9 verwendet wird.
5. Reagenzzusammenstellung für ein Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4.

1/1

Fig. 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/00413

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07H1/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07H		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	EP 0 897 978 A (BECTON DICKINSON CO) 24 February 1999 see examples 1-8 ----	1-5
X	EP 0 818 461 A (TOYO BOSEKI) 14 January 1998 see example 1 ----	1-5
X	DE 43 21 904 A (DIAGEN INST MOLEKULARBIO) 12 January 1995 see example 1 ----	1-5
X	WO 96 41811 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;KLEIBER JOERG (DE); WALTER THOMAS (DE);) 27 December 1996 see example 3 -----	1-5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 24 June 1999		Date of mailing of the international search report 06/07/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bardilli, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/00413

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0897978	A	24-02-1999	NONE		
EP 0818461	A	14-01-1998	JP	10075784 A	24-03-1998
DE 4321904	A	12-01-1995	CA	2142910 A	12-01-1995
			WO	9501359 A	12-01-1995
			EP	0658164 A	21-06-1995
			JP	8501321 T	13-02-1996
WO 9641811	A	27-12-1996	DE	19520398 A	12-12-1996
			DE	19537985 A	17-04-1997
			AU	6300796 A	09-01-1997
			CA	2223821 A	27-12-1996
			CN	1192217 A	02-09-1998
			EP	0837871 A	29-04-1998
			NO	975772 A	06-02-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

b nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00413

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07H1/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	EP 0 897 978 A (BECTON DICKINSON CO) 24. Februar 1999 siehe Beispiele 1-8 ----	1-5
X	EP 0 818 461 A (TOYO BOSEKI) 14. Januar 1998 siehe Beispiel 1 ----	1-5
X	DE 43 21 904 A (DIAGEN INST MOLEKULARBIO) 12. Januar 1995 siehe Beispiel 1 ----	1-5
X	WO 96 41811 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;KLEIBER JOERG (DE); WALTER THOMAS (DE);) 27. Dezember 1996 siehe Beispiel 3 -----	1-5

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

24. Juni 1999

06/07/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bardilli, W

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/00413

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0897978	A	24-02-1999	KEINE		
EP 0818461	A	14-01-1998	JP	10075784 A	24-03-1998
DE 4321904	A	12-01-1995	CA	2142910 A	12-01-1995
			WO	9501359 A	12-01-1995
			EP	0658164 A	21-06-1995
			JP	8501321 T	13-02-1996
WO 9641811	A	27-12-1996	DE	19520398 A	12-12-1996
			DE	19537985 A	17-04-1997
			AU	6300796 A	09-01-1997
			CA	2223821 A	27-12-1996
			CN	1192217 A	02-09-1998
			EP	0837871 A	29-04-1998
			NO	975772 A	06-02-1998